



**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**BÚSQUEDA DE MARCADORES DE ESTRÉS POR
EXPOSICIÓN AL AIRE EN ELASMOBRANQUIOS:
USO DE LA PINTARROJA (*Scyliorhinus canicula*)
COMO MODELO FISIOLÓGICO**



ANDREA CASAUCO AGUILAR

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIAS DEL MAR

Puerto Real, septiembre 2018

Dr. Juan Miguel Mancera Romero, Catedrático de Zoología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz (UCA) y **Dña. Cristina Barragán Méndez**, doctoranda en Recursos Marinos por la Universidad de Cádiz como Tutores del Trabajo Fin de Grado titulado “BÚSQUEDA DE MARCADORES DE ESTRÉS POR EXPOSICIÓN AL AIRE EN ELASMOBRANQUIOS: USO DE LA PINTARROJA (*Scyliorhinus canicula*) COMO MODELO FISIOLÓGICO.”, realizada por Dña. Andrea Casaucao Aguilar.,

INFORMAN:

Que el trabajo realizado en la presente Memoria se ha llevado a cabo bajo nuestra dirección en las dependencias del Departamento de Biología de la Universidad de Cádiz.

Y para que así conste firmamos el presente Trabajo Fin de Grado en Puerto Real (Cádiz) a 10 de septiembre de 2018.



Fdo.: Dr. Juan Miguel Mancera Romero
Catedrático de Zoología de la UCA



Fdo.: Dña. Cristina Barragán Méndez
Doctoranda por la Universidad de Cádiz

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Captura global de elasmobranquios	1
1.2. Captura incidental de elasmobranquios	2
1.3. Estrés.....	3
1.4. Características generales de los elasmobranquios	6
1.5. La pintarroja (<i>Scyliorhinus canicula</i> L., 1758).....	7
1.6. Objetivos	8
2. MATERIAL Y MÉTODOS	9
2.1. Mantenimiento de los animales	9
2.2. Diseño experimental en tierra	9
2.3. Diseño experimental a bordo	11
2.4. Parámetros analizados.....	11
2.5. Análisis estadístico	12
3. RESULTADOS	13
3.1. Experimento en tierra.....	13
3.1.1. Lactato en plasma	13
3.1.2. Otros metabolitos en plasma	14
3.2. Experimento en barco	16
4. DISCUSIÓN	18
4.1. Requerimiento energético	18
4.2. Desequilibrio iónico.....	19
5. CONCLUSIONES.....	21
6. BIBLIOGRAFÍA	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Capturas globales de peces cartilaginosos desde 1950 hasta 2014.....	1
Figura 2. Osmorregulación en elasmobranquios.....	5
Figura 3. Clasificación de la Clase Chondrichthyes	6
Figura 4. Vista ventral y dorsal de la Pintarroja (<i>Scyliorhinus canicula</i>).....	7
Figura 5. Diseño experimental del presente Trabajo de Fin de Grado.....	10
Figura 6. Concentración de lactato en plasma (mM) en el experimento llevado a cabo en tierra.	13
Figura 7. Osmolalidad en plasma (mOsm / kg) en el experimento llevado a cabo en tierra.....	16
Figura 8. Lactato en plasma (mM) en el experimento a bordo	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Glucosa y triglicéridos (TAG) en plasma (mM) en <i>S. canicula</i> en el experimento de tierra.....	15
---	----

RESUMEN

La nueva normativa de la Política Pesquera Común (PPC) tiene como objetivo principal la eliminación de los descartes. Para ello se propone que todas las especies sean desembarcadas salvo que se demuestre científicamente que sobreviven tras el proceso de pesca. Los elasmobranchios son especies muy vulnerables a sufrir grandes descensos en las poblaciones por sobreexplotación o capturas accidentales. Durante la captura, estos animales pasan largos periodos de exposición al aire produciéndoles estrés. El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado es evaluar la capacidad de recuperación de la pintarroja, *Scyliorhinus canicula*, para desarrollar una metodología que analice las tasas de supervivencia. Para ello, se trasladaron ejemplares juveniles y adultos a las instalaciones de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz. Para evaluar el estrés debido a la exposición al aire, los animales fueron aclimatados en un periodo de 17 días y divididos en dos grupos: uno control y otro estresado mediante emersión durante 18 minutos, tiempo tras el cual se devolvieron a sus tanques con agua. Se analizaron parámetros plasmáticos de la respuesta secundaria al estrés: glucosa, triglicéridos, lactato y osmolalidad en tres puntos de muestreo, a las 0 horas (inmediatamente después de la exposición al aire), y tras 5 y 24 horas de recuperación. Después de la emersión se observó un aumento de concentración de lactato, glucosa y osmolalidad y una disminución en triglicéridos. Tras 5 horas, los niveles tanto de lactato como de glucosa y osmolalidad comenzaron a disminuir hasta alcanzar sus niveles basales a las 24 horas. Una vez encontrados unos marcadores de estrés en esta especie, se desarrolló un experimento a bordo de un buque de pesca de arrastre de fondo. Se capturaron 10 pintarrojas a una profundidad de 60 m, y otras 10 a 500 m y se mantuvieron en tanques con agua a bordo. Se analizó el lactato en plasma tras el momento de captura (tiempo 0 h) y tras 24 h de recuperación. No se apreciaron diferencias según la profundidad. Ambos grupos de profundidad mostraron valores similares de lactato en los dos tiempos de muestreo. A la vista de los resultados, los animales se recuperan tras el proceso de emersión y captura en 24 h, siendo el lactato el biomarcador de estrés más relevante.

Palabras clave: Captura incidental, estrés, emersión, homeostasis, lactato, plasma, *Scyliorhinus canicula*.

ABSTRACT

The new reform of the common fisheries policy has the purpose to eliminate the discards. For that is suggested that all the species have to be unload excepting the species that could be demonstrated cientifically that survive after the process of fishing. The elasmobranchs are species very vulnerable to suffer drops in the population because of the overuse or incidental captures. During the capture, the animals have to pass long periods of air exposure evoking stress responses. The main goal of this project is to evaluate the capacity of recuperation in the *Scyliorhinus canicula* and develop a methodology to analyse the survival rate. For that, young and adult specimens were translated to the Faculty of Marine Sciences and Environmental Sciences of the University of Cádiz. To evaluate the stress caused by air exposure, the animals were acclimated in a period of 17 days and divided in two groups: a control group and a stressed group by 18 minutes of air exposure. The secondary metabolites of the stress response were analysed: glucose, triglycerides, lactate and osmolality in three sample points, at the 0 hours (immediately after the air exposition), and after 5 and 24 hours of recovery. An increase of the concentration of lactate, glucose and osmolality was observed after the emersion. After 5 hours, the levels of lactate, glucose and osmolality started to decrease until the basal levels at the 24 hours. In an experiment aboard a bottom-trawling vessel, plasma lactate was analysed in two trawling casts done at 60 m and 500 m depth. The sample points were two: at the 0 hour (immediately after the air exposition) and after 24 hours of recovery. There were not differences at depth in both, and the recovery occurs within 24 hours, like in the land experiment. At the view of the results, the animals were recovered after the emersion and capture, with the lactate arising as the most relevant stress biomarker in this species.

Keywords: Incidental capture, stress, emersion, homeostasis, lactate, plasma, *Scyliorhinus canicula*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Captura global de elasmobranquios

La captura de los elasmobranquios se debe, en parte, al elevado precio de su carne y órganos, especialmente sus aletas. Esto provoca la muerte de 26 a 73 millones de individuos cada año, produciendo un beneficio económico entre 400-550\$ millones anuales (Clarke et al., 2007).

Las capturas mundiales de tiburones se triplicaron desde 1950 hasta el año 2000, llegando a un máximo histórico con 888 mil toneladas (FAO, 2015). Con estas cifras se aprobó el Plan de acción internacional de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO) en el año 1999 para la conservación y ordenación de los tiburones (PAI-Tiburones). El objetivo principal de dicho Plan fue incitar a los países a elaborar Planes de Acción Nacionales (PAN) relativos a la conservación de los tiburones para 2001. Como muestra la Figura 1 la tendencia ha ido decreciendo con un total de 750 mil toneladas en 2014.

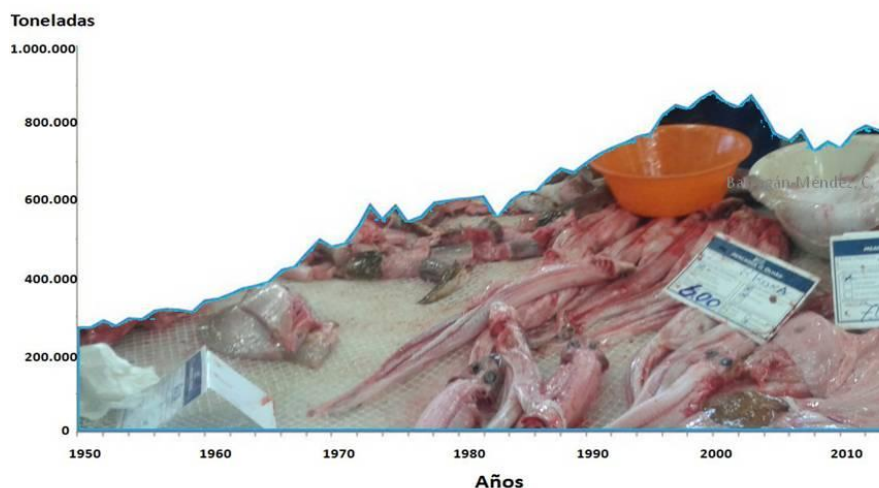


Figura 1. Capturas globales de peces cartilaginosos desde 1950 hasta 2014 (FAO, 2015). Imagen modificada por Barragán-Méndez, C.

España es uno de los mayores productores y exportadores de aleta de tiburón que, en gran medida, es exportada a China. Desde el 2000 al 2011 se ha calculado que España ha contribuido con un total del 8% del total mundial de capturas por año (61 293 toneladas por año). En este periodo fue el tercer país con cuotas de captura más

elevadas, después de Indonesia e India (FAO, 2015). La carne de tiburón se exporta principalmente a mercados de la unión europea, principalmente Italia (FAO, 2015). Por otro lado, la mayoría de los importes, son producto del desembarque en puertos españoles de barcos pesqueros extranjeros, principalmente portugueses.

Existen estudios que indican que estas cifras son menores a las reales debido a la falta de declaración, registro inadecuado de datos y subestimaciones premeditadas (Clarke et al., 2005). Esta falta de información puede ser debida también a la pesca incidental de estos animales, que en muchos casos aumenta debido a que las especies objetivo son menos accesibles, ya sea por la disminución del recurso o por restricciones reglamentarias.

1.2. Captura incidental de elasmobranquios

Las capturas incidentales o bycatch son aquellos organismos que se capturan accidentalmente y que no son devueltos al mar. Sin embargo, los descartes, se consideran las capturas que no se usan y se devuelven al mar (Borges & O'Dor, 2010).

Algunas de estas especies capturadas accidentalmente tienen un alto valor económico, por lo que se retienen y se venden, mientras que otras son descartadas al no tener un valor en el mercado, una cuota u otra restricción legal (Costa et al, 2008). Los descartes pueden producir serios problemas en las poblaciones de las especies, tanto de las que son objetivo como las que no lo son. Los condriictios, debido a su baja fecundidad, una tardía madurez sexual y ciclos de vida largos están considerados entre las especies más vulnerables a ser capturadas accidentalmente (Camhi et al. 1998). Según el criterio de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) un 24% de especies de condriictios están amenazadas debido a la sobrepesca, tanto dirigida como incidental. Este porcentaje representa 249 especies que se encuentran dentro de las categorías “en peligro crítico” (*critically endangered*) (17,4%), “en peligro” (*endangered*) (2,4%) y “vulnerable” (4,1%) de un total de 1041 especies evaluadas por la UICN (Dulvy et al. 2014).

La Política Pesquera Común (PPC) tiene como objetivo eliminar los descartes desembarcando todas las capturas gestionadas bajo Total de Capturas Admitidas (TAC) o tallas mínimas (Artículo 15 del Reglamento 1380/2013/EU). Esta nueva normativa

provoca serios problemas económicos para el sector pesquero por lo que existen ciertas excepciones. El Artículo 13 del mismo Reglamento señala que los pescadores podrán continuar devolviendo al mar las especies que presenten alta supervivencia tras la captura. Además, el Artículo 2 cita: “la PPC aplicará a la gestión de la pesca un enfoque ecosistémico a fin de garantizar que las actividades pesqueras tengan un impacto negativo mínimo en el ecosistema marino, y se esforzará por garantizar que las actividades de la pesca eviten la degradación del medio marino”. Es por este motivo que existen diversos estudios a nivel mundial que están estudiando la supervivencia de diferentes especies, artes de pesca y áreas geográficas distintas (Reglamento CE). En España, la Universidad de Cádiz, en colaboración con el Instituto Español de Oceanografía lleva varios años realizando diferentes estudios de supervivencia y recuperación fisiológica tras la pesca.

1.3. Estrés

Para poder evaluar la capacidad de supervivencia de los animales tras la captura, es necesaria una aproximación que incluya su capacidad de recuperación. Se ha demostrado que la pesca supone un proceso de estrés para los animales (Murray et al., 2015). El estrés podría definirse como una condición en la cual el equilibrio dinámico (homeostasis) del animal se ve amenazado o perturbado como resultado de la acción de estímulos, internos o externos, denominados agentes estresantes. Estos agentes perturban el equilibrio homeostático y desencadenan la respuesta integrada al estrés, junto con un conjunto de cambios coordinados que se creen compensatorios y/o adaptativos, permitiendo al animal superar la amenaza (Wendelaar Bonga, 1997). Este estrés puede clasificarse como: i) eustrés, que aparece como una respuesta del organismo bajo situaciones que provocan cambios fisiológicos que ayudan su funcionamiento; ii) diestrés, cuando ciertos factores promueven distintos cambios fisiológicos que pueden comprometer la integridad del organismo (Selye, 1985).

El Síndrome de Adaptación General o GAS (Selye, 1936; 1950) describe de manera generalizada las tres fases experimentadas por los animales ante el estrés. La primera fase, o reacción de alarma inicial, corresponde a la percepción de una posible situación de estrés. La segunda, o fase de resistencia, es el proceso de adaptación ante una situación estresante. Por último, la tercera, o fase de agotamiento, puede producir

estrés crónico o, incluso, la muerte del animal. Dependiendo de la duración del estrés, las respuestas experimentadas pueden dividirse en primarias, secundarias o terciarias. Las respuestas primarias al estrés están asociadas a la actividad neuroendocrina y hormonal, con un rápido incremento de hormonas en la sangre (predominan catecolaminas y corticosteroides) (Barton, 2002). En los elasmobranquios, como en la mayoría de los peces, la adrenalina y la noradrenalina son las principales catecolaminas que aparecen inmediatamente tras la percepción de estresores, incluyendo hipoxia, hipercapnia, ejercicio intenso y manipulación (Mazeaud et al., 1977; Randall and Perry, 1992). Éstas son secretadas por el tejido cromafín (riñones) en respuesta a las señales neuronales. Tanto en elasmobranquios como en los teleósteos, las catecolaminas desencadenan importantes cambios en la función cardiorrespiratoria (Taylor and Butler, 1982; Farrell, 1993; Lai et al., 1997, 2004).

Mediante la estimulación del eje interrenal se liberan corticosteroides al sistema circulatorio en teleósteos (Wendelaar Bonga, 1997), siendo el cortisol, el corticosteroide predominante. Sin embargo, en los elasmobranquios, la 1α -hydroxycorticosterona (1α -OHB) parece tener una función parecida, siendo secretado por una glándula que se encuentra entre los dos lóbulos posteriores del riñón (Hazon and Balment, 1998). La liberación de 1α -OHB parece estar encadenada con la presencia de altos niveles de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), proveniente de la glándula pituitaria como parte del eje hipotálamo-hipofisario-interrenal (HHI). El gran inconveniente es la dificultad para medir 1α -OHB, por lo que se desconoce su función como mediador en la respuesta secundaria al estrés, así como su efecto ante los ciclos reproductivos, osmorregulación e inmunología. Este desconocimiento contrasta con la gran cantidad de estudios describiendo las acciones del cortisol (Gelsleichter, 2004, Manire et al. 2007).

Las **respuestas secundarias** son aquellas derivadas de la acción de estas hormonas. Estas respuestas involucran alteraciones fisiológicas y bioquímicas. Aunque afecta a todos los niveles, suelen ser evaluadas por los cambios bioquímicos en la sangre y músculo. Estas respuestas incluyen la movilización de metabolitos energéticos al torrente sanguíneo y un aumento de la frecuencia cardiorrespiratoria para favorecer la disponibilidad de oxígeno (Black, 1958; Driedzic and Hochachka, 1978).

El proceso de recuperación tras una situación de estrés, (como pueden ser largos periodos de emersión debido a la captura mediante pesca de arrastre), incluye recobrar la homeostasis corporal a niveles sostenibles, mediante el estado basal o mediante el

establecimiento de un estado alostático (McEwen and Wingfield, 2003; Costas et al., 2011). Dentro de los principales metabolitos liberados como respuestas secundarias, la glucosa y el lactato son considerados buenos indicadores de estrés en peces (Arjona et al., 2007). En situaciones de estrés, la movilización de glucosa a través del sistema circulatorio facilita su uso inmediato por aquellos tejidos que necesiten un aporte energético extra. Por otro lado, el lactato se produce en estados de hipoxia como un producto metabólico de la glucólisis (Gladden, 2004). En el caso de los triglicéridos, los ácidos grasos son la principal fuente de energía endógena en elasmobranquios. En situaciones de alta actividad física, estas reservas serán movilizadas hacia tejidos como el músculo (revisiones de Ballantyne, 1997, y de Speers-Roesch and Treberg, 2006b).

Como efectos secundarios de estas respuestas secundarias al estrés, se producirán modificaciones en el sistema osmorregulador de los organismos. Este sistema es el encargado de mantener unos niveles de agua e iones determinados en los fluidos internos del animal. Ante una situación de estrés, como la emersión y la captura, se generarán cambios en la osmolalidad plasmática (Frick et al., 2010; Murray et al., 2015). En el caso de los tiburones marinos, la concentración de sales en sus fluidos corporales es menor que la del medio externo (Evans, D.H. et al., 2004). Como muestra la Figura 2, los elasmobranquios mantienen una osmolalidad similar a la del medio externo mediante la urea y los aminoácidos. Los órganos osmorreguladores que mantienen este desequilibrio con el medio externo son las branquias, la glándula rectal, el intestino y el riñón (Hazon et al., 2003)

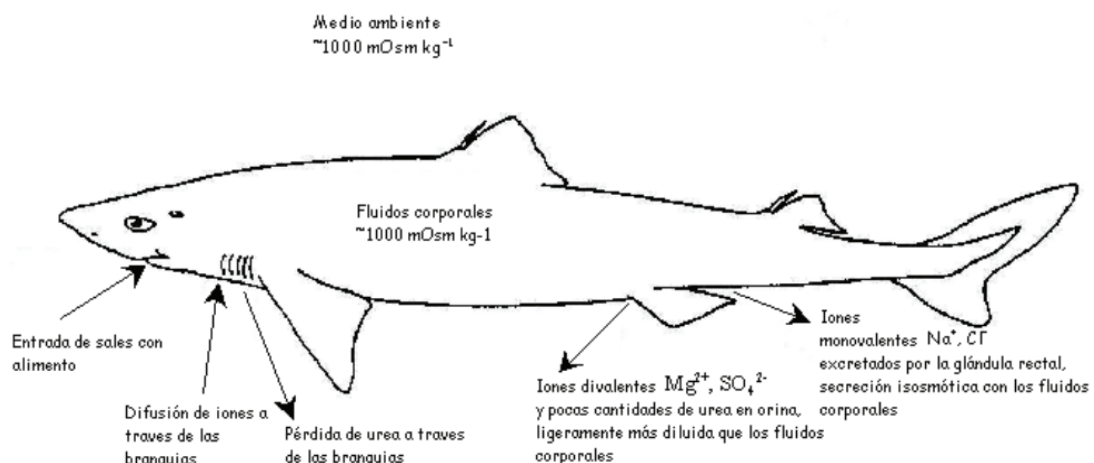


Figura 2. Osmorregulación en elasmobranquios. (imagen tomada de *ocean docs.org*)

Por último, si el estrés se prolonga en el tiempo (estrés crónico), aparecen las **respuestas terciarias**. En este caso, el animal no es capaz de alcanzar la homeostasis llegando a afectar al crecimiento, reproducción y sistema inmune, pudiendo ocurrir incluso la muerte del animal.

1.4. Características generales de los elasmobranquios

La Clase Chondrichthyes (condictios) está compuesta por los tiburones (Superorden Selachimorpha), las rayas (Superorden Batoidea) y las quimeras (Orden Chimaeriformes). La Subclase Elasmobranchii (elasmobranquios) comprende los tiburones y las rayas y la Subclase Holocephali las quimeras.

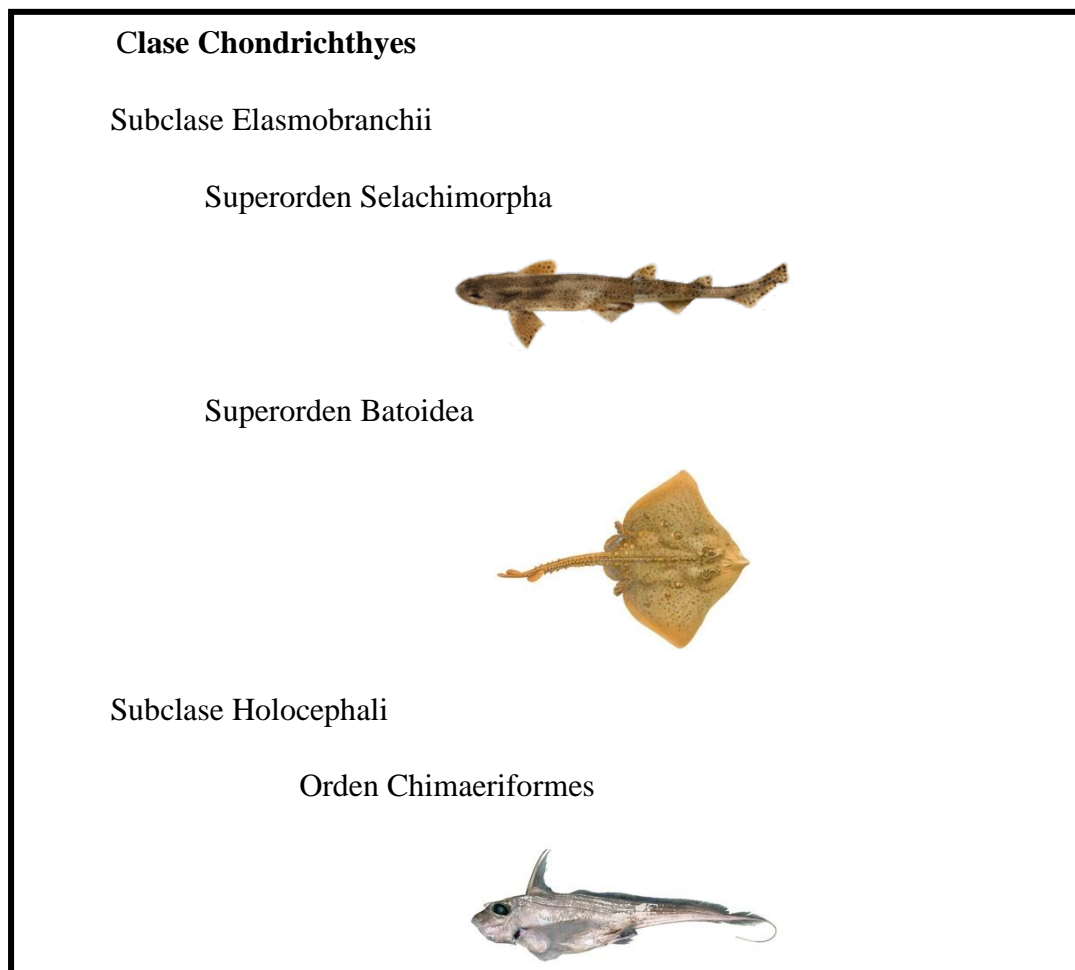


Figura 3. Clasificación de la Clase Chondrichthyes.

Los elasmobranquios forman uno de los grupos más antiguos y más diversos en la línea de los vertebrados. Surgieron hace al menos 420 millones de años, mucho antes que los primeros vertebrados terrestres. Tuvieron una rápida especiación (radiación adaptativa), ocupando los eslabones más altos de la cadena alimenticia acuática y jugando así un papel muy importante en los ecosistemas marinos (Compagno, 1990; Kriwet et al., 2008). Se distinguen por tener en común características como su esqueleto cartilagenoso.

Estos animales presentan una baja tasa de crecimiento, maduración tardía, bajas fecundidades (comparadas con las especies de peces óseos), largos periodos de gestación y de las mayores inversiones maternas de energía del reino animal (Cortés, 2000). Por lo tanto, tasas bajas de crecimiento poblacional y baja capacidad de recuperación frente a la presión pesquera (Musick, 1999b).

1.5. La pintarroja (*Scyliorhinus canicula* L., 1758)

La pintarroja (*Scyliorhinus canicula*) es una especie de elasmobranquio del Orden Carcariniforme. Pertenece a la Familia Scyliorhinidae y fue descrita por Linneo en 1758. Este tiburón presenta una longitud media de 60 cm en la etapa adulta, siendo difícil encontrar medidas superiores a 80 cm (Pizzolla, 2008). Posee cinco pares de hendiduras branquiales y un cuerpo alargado y esbelto. Tiene un morro prominente con unas solapas nasales muy desarrolladas que alcanzan la boca, como muestra la Figura 4.

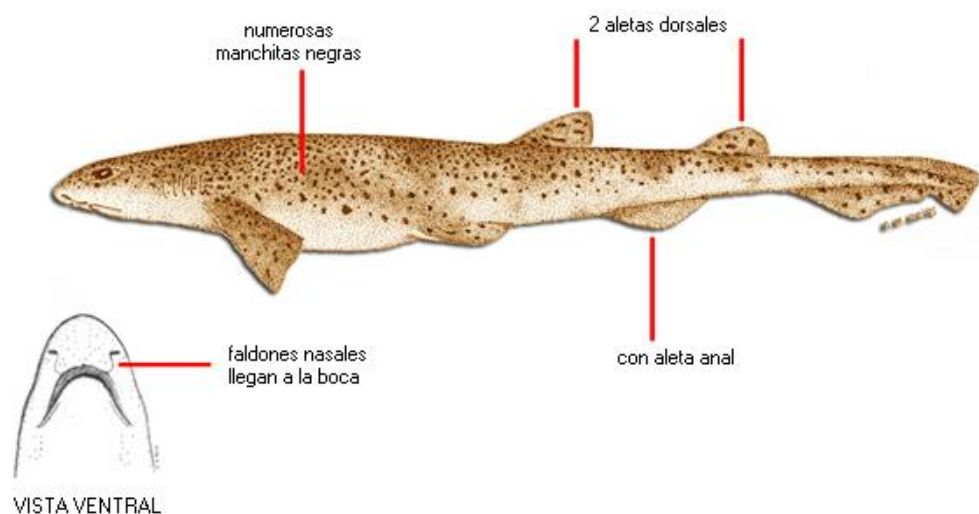


Figura 4. Vista ventral y dorsal de la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*).

Las aletas pectorales son relativamente largas. La primera aleta dorsal se sitúa a la altura de las aletas pélvicas y la segunda a la altura de la aleta anal. La aleta caudal es larga y casi totalmente recta con un largo lóbulo ventral (Compagno, 1984). Tiene una coloración marrón clara y grisácea con pintas oscuras en su superficie siendo blanca en la superficie ventral (Pizzolla, 2008).

Es un tiburón demersal que se distribuye prácticamente por toda la costa europea y la costa noroeste africana. Tiene una amplia distribución batimétrica que comprende desde los 10-100 metros en el Atlántico Noroeste, hasta los 400 metros en el Mar Mediterráneo y desde los 300 hasta los 800 metros en el Mar Jónico (FishBase). En cuanto a la alimentación, la pintarroja se considera un depredador oportunista con una dieta muy variada que comprende desde pequeños invertebrados a pequeños peces óseos (Compagno, 1984).

1.6. Objetivos

El presente Trabajo de Fin de Grado pretende esclarecer los efectos de la emersión producida por la pesca en los elasmobranquios utilizando la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*) como modelo. Para ello se proponen tres objetivos:

1. Estudiar diferentes parámetros indicadores de estrés derivados de la emersión en la pintarroja mediante muestras de plasma.
2. Determinar si se alcanza el estado homeostático basal después de la emersión.
3. Evaluar el modelo en un caso de exposición al aire por pesca de arrastre.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente Trabajo de Fin de Grado se ha realizado gracias a la colaboración de la Universidad de Cádiz con el Centro Oceanográfico del Instituto Español de Oceanografía. Este centro lleva años realizando una serie de campañas “ARSA” para la evaluación de las poblaciones del Golfo de Cádiz. En noviembre del 2016 (ARSA 1116) aportaron 45 individuos de pintarroja (*Scyliorhinus canicula*) capturados mediante pesca de arrastre a bordo del Buque Oceanográfico Miguel Oliver. Estos animales fueron trasladados a la Planta de Cultivos Marinos de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz. Los animales seleccionados fueron de ambos sexos, con un peso medio de 380.6 ± 12.0 g y una longitud total media de 50.7 ± 0.5 cm.

2.1. Mantenimiento de los animales

Una vez trasladados a tierra, los animales fueron aclimatados por un periodo de 17 días en 6 tanques de 400 L. Estos tanques se mantuvieron tapados con una lona, a una temperatura de 19 °C y una salinidad de 38 psu bajo un fotoperiodo natural. Para respetar dicho fotoperiodo, las pintarrojas fueron alimentadas a las 20:00 horas con gambas, calamares, boquerones y sardinas una vez al día. Los animales estuvieron en ayunas 36 horas antes del experimento para evitar desequilibrios osmorreguladores de plasma relacionados con la alimentación (Wood et al., 2007).

2.2. Diseño experimental en tierra

Este experimento se ha realizado en cumplimiento de las directrices del Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación nacional (RD/1201/2005 y Ley 32/2007) para el uso de animales en el laboratorio. Para su correcta manipulación, los animales fueron anestesiados en 0.1 % v/v 2 phenoxyethanol (P-1126, Sigma-Aldrich) y, posteriormente sacrificados mediante decapitación.

Para evaluar el estrés debido a la exposición al aire, los animales fueron divididos en dos grupos: uno control y otro estresado mediante emersión. Como muestra la Figura 5 el grupo control (n = 22) únicamente fue extraído del tanque para el muestreo mientras que los animales del grupo estresado (n = 23) fueron capturados con la mano y

mantenidos en un tanque seco durante 18 minutos (emulando el período mínimo que esta especie es expuesta al aire cuando es capturada y descartada por la pesquería comercial de arrastre de fondo en Europa). Ambos grupos fueron repartidos en tres tanques a razón de 7 - 8 individuos por tanque de tal forma que la toma de muestras se realizó en triplicado.

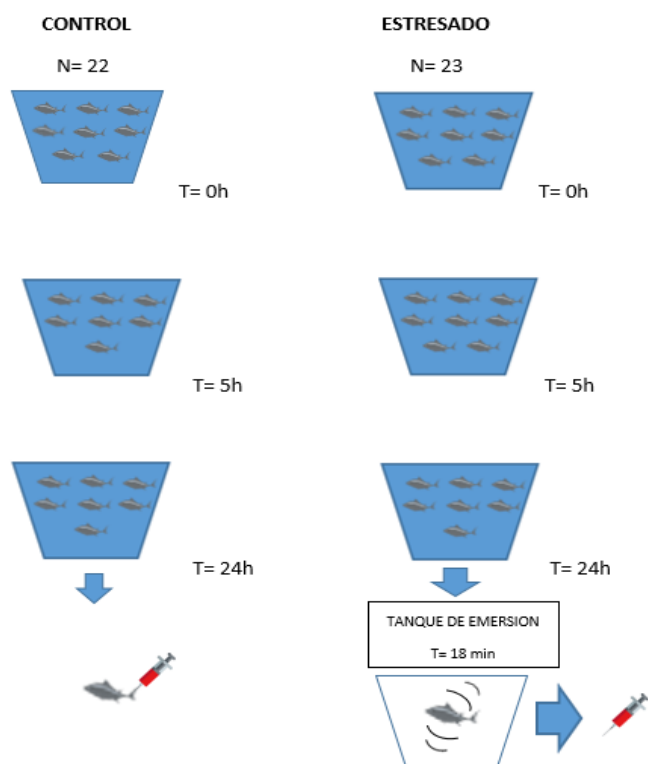


Figura 5. Diseño experimental del presente Trabajo de Fin de Grado. Los ejemplares de *S. canicula* fueron divididos en dos grupos experimentales: uno control y otro expuesto al aire durante 18 minutos. Los animales fueron muestreados justo después de la exposición al aire (tiempo 0 h) y tras 5 h y 24 h de recuperación (n = 7-8).

Se extrajo sangre mediante punción en el pedúnculo caudal con jeringuillas de 1 mL heparinizadas (Heparina amónica Sigma, H-6279) en tres puntos de muestreo: 0 horas (inmediatamente después de la exposición al aire) y tras 5 y 24 horas de recuperación. El plasma fue obtenido mediante una centrifugación a 10.000 g, 4 minutos y, posteriormente fue congelado a -20 °C.

2.3. Diseño experimental a bordo

Los experimentos a bordo del Buque Oceanográfico Miguel Oliver fueron realizados en la parte española del Golfo de Cádiz en noviembre del 2017. Con el objetivo de estudiar el principal marcador indicador de estrés por emersión tras pesca de arrastre, se llevaron a cabo dos lances a las 07.00 UTC. Cada lance tuvo una duración de una hora a unos 3 nudos como así lo describe Anon, 2015. Debido a la amplia distribución batimétrica que presenta *S. canicula*, los lances fueron realizados a 60 m y 500 m con el objetivo de estudiar si existen diferencias en las respuestas de estrés debidas a la profundidad.

Una vez que la red llegaba al barco, los animales, seleccionados al azar, se mantuvieron durante 18 minutos expuestos al aire. Los individuos eran pesados (317 ± 8 g), medidos (45.7 ± 0.4 cm longitud total), sexados e individualmente marcados con una goma elástica colocada en el pedúnculo caudal. Tras ese tiempo de emersión, se tomó una muestra de sangre mediante una punción en el pedúnculo caudal en cada animal con jeringuillas de 1 mL heparinizadas (Heparina amónica Sigma, H-6279). Posteriormente, fueron liberados en tanques de 350 L en circuito abierto (agua recogida desde la superficie del mar) durante 24 horas, tiempo tras el cual, los animales eran muestreados de nuevo y liberados al mar. El plasma fue obtenido mediante una centrifugación a 10.000 g, 4 minutos y, posteriormente fue congelado a -20 °C.

2.4. Parámetros analizados

El tratamiento de las muestras se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias del mar y Ambientales de Puerto Real en noviembre del 2017.

La Osmolalidad se midió en 20 μ L de muestra mediante un osmómetro de presión de vapor (Fiske One-Ten Osmometer).

La determinación de lactato (ref. 1001330), glucosa (ref. 1001200), y triglicéridos (ref. 100131101) se realizó mediante kits comerciales de Spinreact, que se basan en técnicas colorimétricas. Para leer las microplacas de 96 pocillos se utilizó un espectrofotómetro PowerWave 340, junto con el Software KCjunior.

- Lactato: la cantidad de lactato en plasma se determinó mediante la relación entre la absorbancia medida y la concentración de lactato de una recta patrón realizada con dos concentraciones estándar: 0 y 10 mg dL⁻¹. Se pipetearon 10 µL de muestra (sin diluir) por duplicado y 10 µL de estándar por triplicado. Posteriormente, con una pipeta de repetición, se añadieron en todos los pocillos de la microplaca (a excepción del blanco) 200 µL de disolución reactiva y se introdujo en la estufa a 37 °C durante 5 minutos, tiempo tras el cual se midió a una longitud de onda de 490 nm (empleando 630 nm como referencia)
- Glucosa: para la recta patrón también se emplearon dos concentraciones: 0 y 200 mg dL⁻¹. Al igual que en el lactato, se pipetaron 10 µL de muestra sin diluir (por duplicado), 10 µL de estándar por triplicado y 200 µL de reactivo en todos los pocillos a excepción del blanco. La lectura de la placa se realizó a una longitud de onda de 340 nm (empleando 550 nm como referencia).
- Triglicéridos (TAG): la concentración de los estándares para realizar la recta patrón fueron 0 y 200 mg dL⁻¹. Como se realizó para los metabolitos anteriormente descritos, se pipeteó 10 µL de muestra y estándar (por duplicado y triplicado, respectivamente) y 200 µL del reactivo en todos los pocillos (a excepción del blanco). La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 490 nm (empleando 550 nm como referencia).

2.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 7. La normalidad y homocedasticidad de las varianzas fueron comprobadas mediante los test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Para analizar los resultados en el experimento en tierra, se aplicó un ANOVA de dos vías con el grupo (control y estresado) y los tiempos de muestreo (0 h, 5 h y 24 h) como factores independientes. En el caso del experimento a bordo, se utilizó un ANOVA de muestras pareadas con la profundidad (60 m y 500 m) y los tiempos de muestreo (0 h y 24 h) como factores independientes. Cuando el ANOVA indicaba diferencias significativas, se utilizó un test *post hoc* de Tukey para identificar diferencias significativas entre grupos. Las diferencias significativas fueron aceptadas cuando $p < 0,05$. Todos los resultados son representados como la media \pm error estándar de la media (ESM).

3. RESULTADOS

3.1. Experimento en tierra

El experimento en tierra se llevó a cabo con el objetivo de describir los parámetros indicadores de estrés más relevantes en *Scyliorhinus canicula* cuando es sometida a emersión.

3.1.1. Lactato en plasma

En la Figura 6 se muestran las concentraciones de lactato en plasma (mM) para los grupos expuesto al aire (representado en negro) y control (representado en gris) así como los tiempos de muestreo: inmediatamente después de la emersión (0 horas), 5 y 24 horas después. Las letras muestran diferencias significativas para el grupo estresado mientras que los asteriscos señalan diferencias entre ambos grupos para un mismo tiempo.

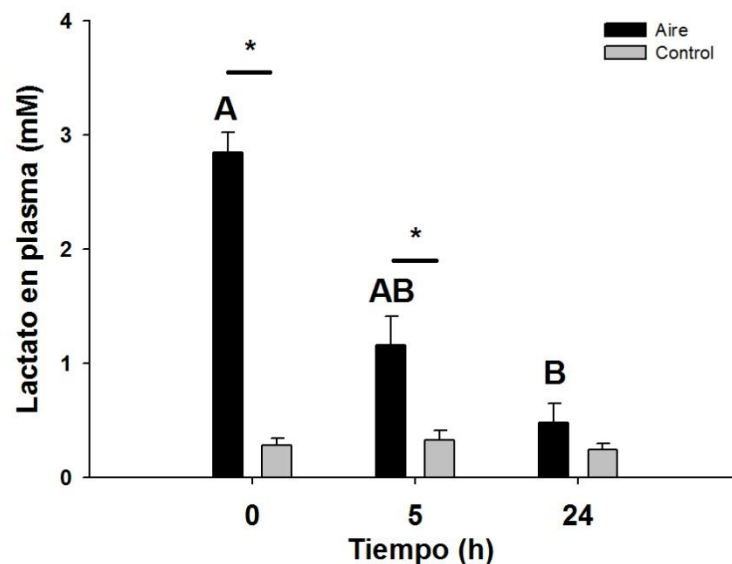


Figura 6. Concentración de lactato en plasma (mM) en el experimento llevado a cabo en tierra. El color negro representa el grupo expuesto al aire durante 18 minutos y el gris el grupo control. El plasma fue obtenido en tres puntos de muestreo: justo después del proceso de estrés (0 h) y en dos tiempos distintos de recuperación (5 h y 24 h). Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del grupo emergido. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre los dos grupos para el mismo tiempo de muestreo (ANOVA de dos vías seguido por un test *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$, $n = 7 - 8$).

El lactato en plasma, como uno de los principales biomarcadores secundarios de estrés, mostró altas concentraciones justo después de la exposición al aire (2.84 ± 0.18 mM) en el grupo estresado. Estos niveles son 10 veces más altos que los registrados en el grupo control (0.28 ± 0.06 mM) para este tiempo. A las cinco horas del proceso de emersión puede observarse una disminución gradual de la concentración de lactato en el grupo expuesto al aire (1.16 ± 0.25 mM). Sin embargo, estos valores siguen siendo superiores a la concentración de lactato en el grupo control para este mismo tiempo (0.33 ± 0.09 mM). Veinticuatro horas después de la exposición al aire, se alcanzaron los niveles más bajos en el grupo estresado (0.48 ± 0.17 mM) estando muy próximos a los niveles del lactato del grupo control (0.24 ± 0.06 mM).

Tras tratar los datos con un ANOVA de dos vías (con los dos grupos y los tres puntos de muestreo como factores independientes), pudo afirmarse que existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo estresado justo después de la exposición al aire y 5 horas después ($p < 0.05$). Sin embargo, 24 horas de recuperación después, no hay diferencias significativas entre ambos grupos. Conocidas dichas diferencias significativas y, tras aplicar el test de Tukey, puede observarse en la Figura 6, que el grupo estresado presenta diferencias significativas entre las 0 y las 24 h.

3.1.2. Otros metabolitos en plasma

La Tabla 1 muestra las concentraciones de dos metabolitos relevantes de las respuestas secundarias ante situaciones de estrés en tiburones: la glucosa y los triglicéridos (TAG). Los resultados están representados para cada grupo (control y estresado) en los tres tiempos de muestreo (0, 5 y 24 h) con la media \pm ESM.

Como muestra la Tabla 1, las concentraciones de glucosa del grupo estresado y el grupo control son similares a tiempo 0 h (3.06 ± 0.28 mM y 1.98 ± 0.26 mM, respectivamente). A las 5 horas existen diferencias significativas en la concentración de glucosa para ambos grupos, siendo el doble en el grupo emergido (4.34 ± 0.60 mM) que en el grupo control (2.08 ± 0.60 mM). 24 horas después, las concentraciones del grupo estresado y el grupo control volvieron a ser similares siendo las concentraciones 3.36 ± 0.43 mM y 2.68 ± 0.40 mM, respectivamente (ANOVA de dos vías seguido por un test *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$).

Tabla 1. Glucosa y TAG en plasma (mM) en *S. canicula* en el experimento de tierra. El plasma fue obtenido, para el grupo expuesto al aire y el grupo control, en tres puntos de muestreo: justo después del proceso de pesca (0 h) y en dos tiempos distintos de recuperación (5 h y 24 h). Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre los dos grupos para el mismo tiempo (ANOVA de dos vías seguido por un test post hoc de Tukey, $p < 0.05$, $n = 7 - 8$). Los datos representan la media \pm ESM.

Parámetro	Grupo	0 h	5 h	24 h
Glucosa	Aire	3.06 ± 0.28	4.34 ± 0.60 *	3.36 ± 0.43
	Control	1.98 ± 0.26	2.08 ± 0.19	2.68 ± 0.40
TAG	Aire	1.73 ± 0.16	1.29 ± 0.23 *	1.50 ± 0.16
	Control	1.97 ± 0.20	2.06 ± 0.24	1.96 ± 0.08

En cuanto a los TAG, puede observarse en la Tabla 1, que las concentraciones justo después del proceso de emersión son similares en el grupo expuesto al aire y el grupo control (1.73 ± 0.16 mM y 1.97 ± 0.20 mM, respectivamente). Sin embargo, tras 5 horas las concentraciones de TAG disminuyen significativamente en el grupo estresado (1.29 ± 0.23 mM) siendo la concentración menor que en el grupo control (2.06 ± 0.24 mM). A las 24 horas los valores de TAG son similares en ambos grupos (1.50 ± 0.16 mM en el grupo estresado y 1.96 ± 0.08 mM en el grupo control).

3.1.3. Omolalidad en plasma

La Figura 7 muestra la osmolalidad para el grupo emergido (negro) y el grupo control (gris) frente a los tres tiempos de muestreo: inmediatamente después del estrés (0 h), 5 y 24 horas después. Las letras muestran diferencias significativas para el grupo estresado mientras que los asteriscos señalan diferencias entre ambos grupos para un mismo tiempo.

Como consecuencia de la exposición al aire, pueden darse desequilibrios en la osmoregulación como efectos secundarios de las respuestas ante el estrés. La osmolalidad en plasma presentó altas concentraciones justo después del proceso de emersión (968 ± 8 mOsm/kg) en el grupo estresado. Unos niveles superiores en comparación con el grupo control (923 ± 5 mOsm/kg). Cinco y veinticuatro horas después de la exposición al aire, la osmolalidad presentó niveles similares en el grupo

expuesto al aire (934 ± 9 mOsm/kg y 914 ± 6 mOsm/kg, respectivamente) y el grupo control (927 ± 8 mOsm/kg y 929 ± 9 mOsm/kg, respectivamente).

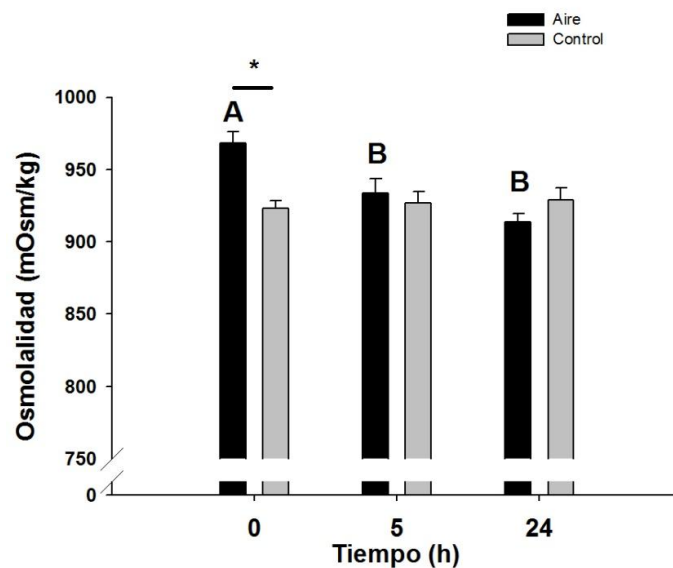


Figura 7. Osmolalidad en plasma (mOsm/kg) en el experimento llevado a cabo en tierra. El color negro representa el grupo expuesto al aire durante 18 minutos y el gris el grupo control. El plasma fue obtenido en tres puntos de muestreo: justo después del proceso de estrés (0 h) y en dos tiempos distintos de recuperación (5 h y 24 h). Las letras indican diferencias significativas dentro del grupo emergido. Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre los dos grupos para el mismo tiempo (ANOVA de dos vías seguido por un test *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$, $n = 7 - 8$).

Al tratar estos datos con un ANOVA de dos vías (con los dos grupos y los tres puntos de muestreo como factores independientes), pudo afirmarse que existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo estresado justo después de la exposición al aire ($p < 0.05$). Sin embargo, tras 5 horas de recuperación, no hay diferencias significativas entre ambos grupos. Conocidas las diferencias significativas y, tras aplicar el test de Tukey, la Figura 7 muestra que el grupo estresado presenta diferencias significativas entre las 0 y los dos puntos de muestreo tras 5 y 24 horas de recuperación.

3.2. Experimento en barco

A partir de los resultados del experimento anterior, se seleccionó el lactato como biomarcador de estrés más representativo en *S. canicula* bajo las condiciones de emersión del presente Trabajo de Fin de Grado. La Figura 8 muestra los valores de lactato en plasma de los animales capturados a 60 m y a 500 m. Tal y como se indicó en

el Material y Métodos, los animales fueron muestreados justo después del proceso de pesca (negro) y 24 horas de recuperación después (gris).

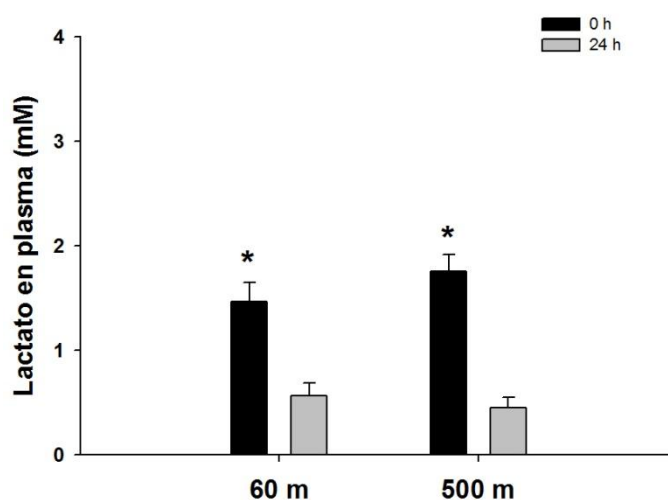


Figura 8. Lactato en plasma (mM) en el experimento a bordo. El color negro representa los animales muestreados justo después de la pesca de arrastre y el color gris los mismos animales muestreados tras 24 horas de recuperación. En el eje de la X se encuentran dos grupos capturados a diferentes profundidades: 60 m ($n = 10$) y 500 m ($n = 10$). Los asteriscos (*) muestran diferencias significativas entre los tiempos 0 h y 24 h en animales capturados a la misma profundidad (ANOVA de dos vías de muestras pareadas seguido por un test *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$).

Los valores de lactato en plasma más altos correspondieron al tiempo 0 h, es decir, justo después de la captura (1.47 ± 0.18 mM a 60 m y 1.75 ± 0.16 mM a 500 m). Tras 24 horas de recuperación las concentraciones disminuyeron notablemente (0.56 ± 0.13 mM a 60 m y 0.45 ± 0.10 mM a 500 m). Al tratar estos datos con un ANOVA de dos vías de muestras pareadas (con los dos tiempos de muestreo y las dos profundidades como factores independientes), puede observarse que existen diferencias significativas entre los dos tiempos de muestreo para cada profundidad ($p < 0.05$). El test *post hoc* de Tukey no mostró diferencias significativas entre las dos profundidades.

4. DISCUSIÓN

En el presente Trabajo de Fin de Grado, se proporcionan evidencias sólidas que demuestran que la pintarroja (*S. canicula*) logra regresar exitosamente a sus niveles homeostáticos de plasma después de un evento de emersión y de captura mediante pesca de arrastre. Las concentraciones plasmáticas de variables relacionadas con el estrés vuelven a los niveles basales en peces capturados a 60 y 500 m de profundidad en menos de 24 h. Cabe señalar que los resultados observados son temporalmente explícitos y restringidos a un buque que despliega su arte durante 60 minutos.

4.1. Requerimiento energético

Durante una situación de estrés agudo, los elasmobranquios aumentan el consumo de oxígeno incrementándose el metabolismo anaerobio. Por lo tanto, como subproducto de la glucólisis se forma lactato (Murray et al., 2015). Los resultados del experimento en tierra (Figura 6) y del experimento a bordo (Figura 8), mostraron un aumento del 90.15 % en los niveles de lactato en plasma inmediatamente después del estrés. Este aumento en la concentración plasmática de lactato ha sido anteriormente publicada como consecuencia del estrés en los elasmobranquios (Skomal, 2007). Pasadas las 5 horas, los niveles de lactato comenzaron a disminuir hasta las 24 horas. Estos resultados están en el rango de concentraciones de lactato descritas en estudios previos realizados en otras especies de tiburones después de la captura (Cliff y Thurman, 1984; Mandelman y Farrington, 2007), regresando a niveles basales o niveles bajos encontrados en cautiverio (Mandelman y Farrington, 2007) o después de un período de recuperación, como se ha confirmado en el presente Trabajo de Fin de Grado. Teniendo en cuenta que las concentraciones plasmáticas de lactato en los dos experimentos realizados en el presente estudio coinciden entre sí, podríamos afirmar que la captura de arrastre y la exposición al aire son procesos estresantes emparejados en *S. canicula*. La fortaleza de este TFG reside en combinar un estudio de campo respaldado por un experimento de campo controlado, lo que refuerza la idea de que los niveles de lactato después de 24 horas en la experiencia a bordo son los de los tiburones no estresados.

En condiciones de estrés, la movilización de glucosa a través del sistema circulatorio facilita su uso inmediato por aquellos tejidos que necesiten de un aporte energético extra (Speers-Roesch and Treberg, 2010). Como muestra la Tabla 1, el experimento en tierra indica una movilización de glucosa tardía, reflejada en un aumento significativo a las 5 horas. Esto respalda una posible hipoglucemia después de un período inicial de hiperglucemia (Frick et al., 2010a). Experimentos previos han indicado diferentes respuestas relacionada con la movilización de glucosa dependiendo de la especie de tiburón. Varios autores han mostrado niveles circulantes elevados de concentraciones de glucosa como respuesta fisiológica al estrés en elasmobranquios (Cliff y Thurman, 1984; Frick et al., 2010a), otros estudios encontraron concentraciones deprimidas de glucosa en plasma en el tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*), tiburones toro (*Carcharhinus leucas*) y mielga (*Squalus acanthias*) después de la captura (Manire y Hueter, 2001), mientras que otros estudios no informaron cambios en la glucosa del tiburón azul capturado (*Prionace glauca*) (Moyes et al., 2006). Debido a las variaciones que pueden darse en la concentración de glucosa a través del balance homeostático, la dieta, etc (Gutierrez et al.1984), la glucosa no es un biomarcador de estrés tan eficiente como el lactato. En una situación de captura y emersión, el lactato es el principal metabolito indicador de estrés debido a que está estrechamente relacionado con el metabolismo anaeróbico debido a ejercicio exhaustivo (Balmaceda-Aguilera et al.2012).

Los niveles plasmáticos de TAG están relacionados positivamente con el factor de condición y son un enfoque apropiado para evaluar la salud en los tiburones (Gallagher et al., 2014b). Los tiburones carecen de tejido adiposo, y el hígado es el principal sitio de almacenamiento de lípidos con TAG entre las clases de lípidos primarios almacenados (Speers-Roesch and Treberg, 2010). Como muestran los resultados del presente TFG, este metabolito se moviliza a través del plasma, para su utilización en tejidos periféricos como fuente de energía.

4.2. Desequilibrio iónico

Como efecto secundario de las respuestas secundaria del estrés, aparecen desequilibrios en otros solutos plasmáticos y, por lo tanto, un aumento en la osmolalidad sanguínea (Skomal, 2007; Frick et al., 2010a) como muestra la Figura 7.

Esta respuesta coincide con los resultados previos en *S. acanthias* (Mandelman y Farrington , 2007) o *P. glauca* (Moyes et al., 2006). La estrategia osmótica de los tiburones incluye el mantenimiento de altos niveles de osmolalidad plasmática a través de niveles elevados de sales orgánicas como la urea (Evans y Kormanik, 1985). Algunos estudios han informado disminuciones transitorias en las concentraciones plasmáticas de urea atribuidas a compromisos inducidos por estrés horas después del período posterior a la captura (Mandelman y Farrington, 2007; Frick et al., 2010a; Skomal y Mandelman, 2012).

5. CONCLUSIONES

1. El lactato podría considerarse el biomarcador de estrés más relevante en *Scyliorhinus canicula* en situaciones de captura y emersión.
2. La pintarroja recupera su equilibrio homeostático inicial tras 24 horas de recuperación después de un evento de pesca de arrastre.
3. La profundidad de captura no afecta a la recuperación fisiológica utilizando el lactato como biomarcador de estrés.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Anon. (2015). Report of the 2015 blue shark data preparatory meeting. Tenerife, España, March 23 to 27:33p.
- Arjona, F. J., Vargas-Chacoff, L., Ruiz-Jarabo, I., Martin del Rio, M. P., and Mancera, J. M. (2007). Osmoregulatory response of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) to changes in environmental salinity. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 148: 413-421.
- Ballantyne, J.S. (2015) Jaws II: metabolism of elasmobranchs. En: Shadwick, R.E., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (eds) *Physiology of elasmobranch fishes: processes*, 1st edn. Academic Press, United States, pp 395–456.
- Barton, B. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), pp.517-525. doi: 10.1093/icb/42.3.517.
- Balmaceda-Aguilera, C., Cortes-Campos, C., Cifuentes, M., Peruzzo, B. Mack, L. Tapia, J.C. (2012). Glucose transporter 1 and monocarboxylate transporters 1, 2, 4 localization within the glial cells of shark blood-brain-barriers. *PLoS One* 7(2):e32409.
- Black, E.C., (1958). Hyperactivity as a lethal factor in fish. *J. Fish. Res. Board Can.* 15, 573–586.
- Borges, T. C. & O'Dor, R. (2010). Biodiversity and fisheries: a study case in the south coast of Portugal (Algarve). *Discussion Papers – Spatial and Organizational Dynamics* 4: 21 – 31.
- Camhi, M., S.L. Fowler, J.A. Musick, A. Bräutigam & S.V. Fordham. (1998). Sharks and their relatives - ecology and conservation. Occasional paper of the IUCN Species Survival Commission 20: 1-39.
- Clarke, S. (2005). Trade in shark products in Singapore, Malaysia and Thailand. Singapore, Southeast Asian Development Center and ASEAN.
- Clarke, S., Milner-Gulland, E.J. & Bjørndal, T. (2007). Social, economic, and regulatory drivers of the shark fin trade. *Marine Resource Economics*, 22: 305–327.
- Cliff, G., and Thurman, G. D. (1984). Pathological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark, *Carcharhinus obscurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 78: 167-173.

- Compagno, L. J. V. (1984). *Sharks of the World: An Annotated and Illustrated Catalogue of Shark Species Known to Date. Volumen 4, Parte 1. Hexanchiformes to Lamniformes*. FAO. Rome, Italy.
- Compagno, L.J.V. (1990). *Environ Biol Fish* (1990) 28: 33. doi:10.1007/BF00751027
- Cortés, (2000). *Reviews in Fisheries Science* 8:299–344.
- Costa, M. E., Erzini, K. & Borges, T. C. (2008). Bycatch of crustacean and fish bottom trawl fisheries from southern Portugal (Algarve). *Scientia Marina* 72: 801 – 814.
- Costas, B., Conceicao, L. E. C., Aragao, C., Martos, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., Afonso, A. (2011). Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. *Aquaculture* 316(1-4), 68-76.
- Driedzic, W.R., Hochachka, P.W. (1978). Metabolism in fish during exercise. En: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, pp. 503–543.
- Dulvy, N.K., Fowler, S.L., Musick, J.A., Cavanagh, R.D., Kyne, P.M., Harrison, L.R., Carlson, J.K., Davidson, L.N.K., Fordham, S.V., Francis, M.P., Pollock, C.M., Colin, A.S., Burgess, G.H., Carpenter, K.E., Compagno, L.J.V., Ebert, D.A., Gibson, C., Heupel, M.R., Livingstone, S.R., Sanciangco, J.C., Stevens, J.D., Valenti, S. & White, W.T. (2014). Extinction risk and conservation of the world’s sharks and rays. *eLIFE*, 2014;3:e00590.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P. (2004). Homeostasis: Osmoregulation, pH Regulation, and Nitrogen Excretion. En: *Biology of Sharks and Their Relatives.*, Carrier, J.C. Musick, J.A., and Heithaus, M.R., eds. CRC Press, Boca Raton, pp. 247-268.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P. (2005). The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous Waste. En: *Physiological Reviews*. 2005. vol., no. 1, p. 97-177.
- FAO (2015). Felix Dent y Shelley Clarke. State of the global market for shark products. Roma. 196 pp.
- Farrell, A.P., (1993). Cardiovascular system. En: Evans, D.H. (Ed.), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 219–250.
- FishBase,. (2018). Froese, R. and D. Pauly. Editors. World Wide Web electronic publication.

- Frick, L.H., Reina, R.D., Walker, T.I. (2010). Physiological changes and post-release survival of Port Jackson sharks (*Heterodontus portusjacksoni*) and gummy sharks (*Mustelus antarcticus*) following gill-net and longline capture in captivity. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2010;385:29–37.
- Frick LH, Reina RD, Walker TI.(2010). Physiological changes and post-release survival of Port Jackson sharks (*Heterodontus portusjacksoni*) and gummy sharks *Mustelus antarcticus*) following gill-net and longline capture in captivity. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2010;385:29–37.
- Gallagher, A. J., Wagner, D. N., Irschick, D. J., and Hammerschlag, N. (2014b). Body condition predicts energy stores in apex predatory sharks. *Conservation Physiology*, 2: cou022.
- Gelsleichter, J., (2004). Hormonal regulation of elasmobranch physiology. En: Carrier, J.C., Musick, J.A., Heithaus, M.R. (Eds.), *Biology of Sharks and Their Relatives*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 287–323.
- Gladden, L. B. (2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *J Physiol*, 558: 5-30.
- Gutierrez, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Planas, J. (1984) Daily rhythms of insulin and glucose levels in the plasma of *sea bass Dicentrarchus labrax* after experimental feeding. *Gen Comp Endocrinol* 55(3):393–397. doi:10.1016/0016-6480(84)90009.
- Hazon, N., Balment, R.J., (1998). Endocrinology, En: Evans, D.E. (Ed.), *The Physiology of Fishes*, 2 ed. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 441–464.
- Hazon, N., Wells, A., Pillans, R.D., Good, J.P., Anderson, W.G., Franklin, C.E., (2003). Urea based osmoregulation and endocrine control in elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol Biol.* 136, 685–700.
- Kriwet, J., Klug, S. (2008). Diversity and biogeography patterns of Late Jurassic neoselachians (Chondrichthyes, Elasmobranchii). *Journal of the Geological Society London* 295: 55–69.
- Lai, N.C., Korsmeyer, K.E., Katz, S., Holts, D.B., Laughlin, L.M., Graham, J.B., (1997). Hemodynamics and blood properties of the shortfin mako shark (*Isurus oxyrinchus*). *Copeia* 2, 424–428.
- Lai, N.C., Dalton, N., Lai, Y.Y., Kwong, C., Rasmussen, R., Holts, D., Graham, J.B., (2004). A comparative echocardiographic assessment of ventricular function in five species of sharks. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 505–521.

- Mandelman, J. W., and Farrington, M. A. (2007). The physiological status and mortality associated with otter trawl capture, transport, and captivity of an exploited elasmobranch, *Squalus acanthias*. ICES (International Council for the Exploration of the Sea) Journal of Marine Science, 64: 122-130.
- Manire, C., and Hueter, R. (2001). Serological changes associated with gill-net capture and restraint in three species of sharks. Transactions of the American Fisheries Society, 130: 1038-1048.
- Manire, C.A., Rasmussen, L.E.L., Maruska, K.P., Tricas, T.C., (2007). Sex, seasonal, and stress-related variations in elasmobranch corticosterone concentrations. Comp. Biochem. Physiol. A 148, 929–935.
- Mazeaud, M. M., F. Mazeaud, and E. M. Donaldson. (1977). Primary and secondary effects of stress in fish. *Trans. Am. Fish. Soc* , 106201-212.
- McEwen, B. S., and Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43: 2-15.
- Moyes, C. D., Fragoso, N., Musyl, M. K., and Brill, R. W. (2006). postrelease survival in large pelagic fish. Transactions of the American Fisheries Society, 135: 1389-1397
- Murray, C., Connors, R., O'Connor, I., and Dowling, V., (2015). The physiological response and recovery of a common elasmobranch bycatch species: The lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) subject to a controlled exposure event. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 115B(3), 143-156. doi:10.3318/bioe.2015.15.
- Musick, J.A.(1999). Life in the slow lane: ecology and conservation of long-lived marine animals. *Bethesda, Maryland: American Fisheries Society Symposium*. pp. 1–10.
- Pizzolla, P. F. (2008). *Scyliorhinus canicula*. Small-spotted catshark. Marine Life Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom.
- Randall, D. J., and S. F. Perry. (1992). Catecholamines. In W. S. Hoar and D. J. Randall eds.), *Fish physiology*, Vol. 12B, pp. 255–300. Academic Press, New York.
- Reglamento (CE) No 1006/2008 del Consejo de 29 de Septiembre de 2008. Sobre la autorización de las actividades pesqueras de los buques pesqueros comunitarios fuera de las aguas comunitarias y al acceso de los buques de terceros países a las aguas comunitarias, por el que se modifican los Reglamentos (CEE) no 2847/93 y CE) no

- 1627/94 y por el que se deroga el Reglamento (CE) no 3317/94 (OJ L286, 29.10.2008, p. 33).
- Reglamento (UE) n° 1380/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de diciembre de 2013, sobre la política pesquera común, por el que se modifican los Reglamentos (CE) n° 1954/2003 y (CE) n° 1224/2009 del Consejo, y se derogan los Reglamentos (CE) n° 2371/2002 y (CE) n° 639/2004 del Consejo y la Decisión 2004/585/CE del Consejo (DO L 354 de 28.12.2013, p. 22).
- Selye, H., (1936). A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138(3479), pp.32-32.
- Selye, H., (1950). Stress and the General Adaptation Syndrome. *BMJ*, 1(4667), pp.1383-1392.
- Selye H, (1985). The nature of stress. *Basal Facts*. 1985;7(1):3-11. Life history patterns and correlations in sharks.
- Skomal, G.B. (2007). Evaluating the physiological and physical consequences of on post-release survivorship in large pelagic fishes. *Fish. Manag. Ecol.* 14, 81–89
- Speers-Roesch B, Treberg JR (2010) The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. *Comp Biochem Physiol (A)* 155:417–434. doi:10.1016/j.cbpa.2009.09.03
- Taylor, E. W, and Butler, P. J, (1982). Nervous control of heart rate: activity in the cardiac vagus of the dogfish, *J. Appl. Physiol.: Respirat., Environ., Exercise Physiol*, 53, 1330-1335.
- Varga, D., Szabó, A., Hancz, C., Jeney, Z., Ardó, L., Molnár, M., and Molnár, T. (2014). Impact of handling and pre-mortal stress on the flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 66.
- Wendelaar Bonga, S.E., (1997). The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591-625.
- Wood, C. M., Kajimura, M., Bucking, C. P. and Walsh, P. J. (2007a). Osmoregulation, ionoregulation, and acid-base regulation by the gastrointestinal tract after feeding in the elasmobranch (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Biol.* 210, 1335-1349